

试剂组分 (μL)	测定管	对照管
-----------	-----	-----

淀粉磷酸化酶活性测定说明书

(货号: BP10297W 微板法 48 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

淀粉磷酸化酶是植物组织中降解淀粉的关键酶之一, 采用无机磷比色法测定淀粉磷酸化酶活性。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	提取液 70mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 4 支	室温保存	每支: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每支加 1.3mL 蒸馏水混合, 煮沸至呈现透明溶解状态, 待冷却后使用, 室温保存即可。
试剂二	粉体 2 瓶	4℃ 避光保存	每瓶: 1. 开盖前注意使粉体落入底部 (可手动甩一甩); 2. 每支再加 2.6mL 蒸馏水混合溶解, 可 -20℃ 分装冻存。
试剂三	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	A: 粉体 1 瓶 B: 液体 2mL×1 瓶	4℃ 避光保存	1. 临用前加 2.86mL 的 B 液, 再加 22.14mL 的蒸馏水, 混匀溶解备用; 2. 需避光, 现配现用, 变蓝色不能使用。
标准品	粉体 1 支	4℃ 保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

【注】: 全程操作需无磷环境; 试剂配置最好用新的枪头和玻璃移液器等, 也可以用一次性塑料器皿, 避免磷污染。

三、实验器材:

研钵 (匀浆机)、冰盒 (制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅 (烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水 (去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

建议先选取 1-3 个差异大的样本 (例如不同类型或分组) 进行预实验, 熟悉操作流程, 根据预实验结果确定或调整样本浓度, 以防造成样本或试剂不必要的浪费!

1、样本提取:

称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液, 进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取。

2、检测步骤:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 700nm

② 所有试剂解冻至室温 (25℃), 或于 25℃ 水浴中孵育 15min 左右。在 EP 管中依次加入:

提取液	120	120
试剂一	40	40
样本	100	
试剂二	40	40
混匀, 37°C 孵育 20min		
试剂三	100	100
样本		100
混匀, 12000rpm, 4°C 离心 5min, 上清液待测。		

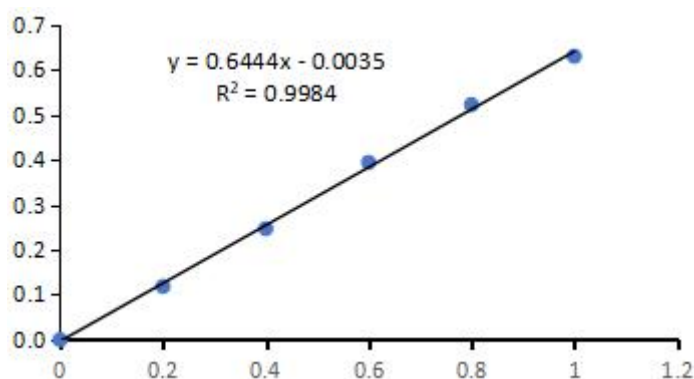
③ 显色反应:

上清液	50	50
试剂四	200	200
混匀, 室温静置 3min, 700nm 下读取各管吸光值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本做一个自身对照)。		

【注】: 若 ΔA 小于 0.01, 则可增加样本加样体积 V_1 (如由 100 μ L 增至 200 μ L, 则提取液相应减少); 若增加孵育时间 T (如由 20min 增至 60min); 或增加样本取样质量 W (如增至 0.2g)。则改变后的 V_1 和 T 和 W 需代入公式重新计算。

五、结果计算:

1、标准曲线方程: $y = 0.6444x - 0.0035$, x 是标准品摩尔浓度 ($\mu\text{mol/mL}$), y 是 ΔA 。



2、按蛋白浓度计算:

定义: 每小时每毫克组织蛋白分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{酶活力}(\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0035) \div 0.6444 \times V_2] \div (V_1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 18.62 \times (\Delta A + 0.0035) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

定义: 每小时每克组织分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0035) \div 0.6444 \times V_2] \div (W \times V_1 \div V) \div T = 18.62 \times (\Delta A + 0.0035) \div W$$

V ---加入提取液体积, 1mL;

V_1 ---加入样本体积, 0.1mL ;

V_2 ---酶促反应总体积, 0.4mL;

T ---反应时间, 1/3 小时;

W ---样本鲜重, g;

Cpr ---样本蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附：标准曲线制作过程：

- 1 标准品用 1mL 提取液溶解。（母液需在两天内用），标准品母液浓度为 50 μ mol/mL。将母液用提取液稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1. μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 20 μ L，加入 980 μ L 蒸馏水，混匀得到 1 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据显色反应阶段测定管的加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	50	
蒸馏水		50
试剂四	200	200
混匀，室温静置 3min，700nm 下读取各管吸光值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$		